

DELPHION

RESEARCH

PRODUCTS

INSIDE DELPHION

Log Out Work Files Saved Searches

My Account

Search: Quick/Number Boolean Advanced Der

Derwent Record

En

View: [Expand Details](#) Go to: [Delphion Integrated View](#)

Tools: Add to Work File: Create new Wor

Derwent Title: **Crosslinked, superparamagnetic polymer beads, useful for isolation and amplification of nucleic acid, made from hydrophilic acrylate and aminoacrylate monomers**

Original Title:  **WO0204555A1: SUPERPARAMAGNETIC PEARL POLYMERS**

Assignee: **KARLOU-EYRISCH K** Individual
NEUMANN R Individual
PODSZUN W Individual
BAYER AG Standard company
 Other publications from [BAYER AG \(FARB\)...](#)

Inventor: **KARLOU-EYRISCH K; NEUMANN R; PODSZUN W;**

Accession/Update: **2002-291768 / 200507**

IPC Code: **B32B 27/00 ; C07H 21/00 ; C08F 220/18 ; C08K 9/08 ; C08L 33/14 ; C12Q 1/68 ; B32B 9/00 ; C07H 21/04 ; C08F 2/14 ; C08F 6/00 ; C08F 220/34 ; C08F 220/56 ; C08J 5/10 ; C08K 3/22 ; C08K 7/18 ; C08K 9/10 ; C08L 33/12 ; C08L 33/26 ; C12M 1/34 ; C12N 11/08 ; C12N 15/09 ; C12P 19/34 ; C12Q 1/00 ; G01N 33/50 ;**

Derwent Classes: **A96; B04; D16; S03; P73; A14;**

Manual Codes: **A04-F06E5**((Meth)acrylic ester (co)polymers use as medical, dental, cosmetic and veterinary) , **A11-C02**(Crosslinking, curing, vulcanisation) , **A12-L04B**(Sensors/measuring - laboratory uses) , **A12-V03C2**(Testing, diagnosis, pathology) , **B04-C03B**(Other addition polymers [exc. poly n-vinyl lactams]) , **B04-E01**(Nucleic acid general and other) , **B04-E03**(Other DNA coding sequences) , **B05-A03A**(Mn, Fe, Cu, Zn, Hg metals and compounds) , **B11-B**(Extraction, separation, recovery, purification, crystallisation) , **B11-C01C** (Other processes) , **B11-C08E3**(Enzyme processes other than polarography or enzyme labelling) , **B11-C08E5**(DNA hybridisation test methods, use of DNA probes) , **B12-K04F** (Tests involving DNA, hybridisation probes etc.) , **D05-A01A2** (Industrial fermentation - polymer carrier) , **D05-H09**(Testing and detection [exc. bacteria, fungi, viruses]) , **D05-H10**(Fixing biological substances or cells to a carrier and the carriers themselves) , **D05-H12A**(Wild-type coding sequences) , **D05-H18B**(DNA amplification method) , **S03-E14H**(Investigation methods for biological material)

Derwent Abstract: ([WO0204555A](#)) **Novelty** - Crosslinked polymer beads (A), doped with superparamagnetic iron oxide (I) and containing basic amino groups, comprises units derived from hydrophilic (meth)acrylate (II) and amino(meth)acrylate (III).
Detailed Description - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:
 (1) method for isolating nucleic acid using (A);
 (2) method for preparing (A); and

(3) method for amplifying nucleic acid by polymerase chain reaction (PCR), particularly Taqman PCR, on the surface of (A).

Use - (A) are used to isolate and/or purify nucleic acid (NA) from cells, tissues, blood or infectious organisms and as carriers for performing (Taqman) polymerase chain reaction. Typical applications are in genetic diagnosis, of human or veterinary disease, also environmental analysis and food testing.

Advantage - (A) are suitable for direct and automated isolation of nucleic acid. Compared with known paramagnetic particles, they have higher adsorption and release rates, so isolation is quicker and involves fewer steps. The recovered nucleic acid is very pure, particularly it has low content of impurities that interfere with amplification, and is well suited for digestion with restriction enzymes.

, Dwg.0/0

Family:

PDF Patent	Pub. Date	Derwent Update	Pages	Language	IPC Code
WO0204555A1 *	2002-01-17	200233	24	German	C08K 9/08
Des. States:	(N) AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW (R) AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT SD SE SL SZ TR TZ UG ZW				
Local appls.:	WO2001EP0007326 Filed:2001-06-27 (2001WO-EP07326)				
US20050014027A1 =	2005-01-20	200507	6	English	B32B 27/00
Local appls.:	US2003000332925 Filed:2003-05-23 (2003US-0332925) WO2001EP0007326 Filed:2001-06-27 (2001WO-EP07326)				
JP2004502851W =	2004-01-29	200413	34	English	C08L 33/14
Local appls.:	Based on WO00204555 (WO 200204555) JP2002000509413 Filed:2001-06-27 (2002JP-0509413) WO2001EP0007326 Filed:2001-06-27 (2001WO-EP07326)				
US6590094 =	2003-07-08	200353	5	English	C07H 21/00
Local appls.:	US2001000903006 Filed:2001-07-11 (2001US-0903006)				
EP1303566A1 =	2003-04-23	200329		German	C08K 9/08
Des. States:	(R) AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI TR				
Local appls.:	Based on WO00204555 (WO 200204555) EP2001000960401 Filed:2001-06-27 (2001EP-0960401) WO2001EP0007326 Filed:2001-06-27 (2001WO-EP07326)				
US20020106659A1 =	2002-08-08	200254	6	English	C12Q 1/68
Local appls.:	US2001000903006 Filed:2001-07-11 (2001US-0903006)				
DE10033583A1 =	2002-01-24	200233	6	German	C08F 220/18
Local appls.:	DE2000001033583 Filed:2000-07-11 (2000DE-1033583)				
→ AU0181904A =	2002-01-21	200234		English	C08K 9/08
Local appls.:	Based on WO00204555 (WO 200204555) AU2001000081904 Filed:2001-06-27 (2001AU-0081904)				

INPADOC [Show legal status actions](#)
Legal Status:

First Claim: [Show all claims](#) 1.Vernetzte Perlpolymerisate dotiert mit superparamagnetischen Eisenoxid und enthaltend basische Aminogruppen, dadurch gekennzeichnet, dass die Perlpolymerisate einpolymerisierte Einheiten aus hydrophilem (Meth)acrylat und Amino(ineth)acrylate erhalten. †

Priority Number:

Application Number	Filed	Original Title
DE2000001033583	2000-07-11	

Chemical Indexing Codes: [Show chemical indexing codes](#)

Extended Polymer Index: [Show extended polymer index](#)

Specific Compound Numbers: [Show specific compounds](#)

Registry Numbers: 03[M2]:1508S 1508U
04[M2]:1508S 1508U

Unlinked Registry Numbers: 1508S 1508U

Related Accessions:

Accession Number	Type	Derwent Update	Derwent Title
C2002-085610	C		
N2002-227840	N		
2 items found			

Title Terms: CROSSLINK POLYMER BEAD USEFUL ISOLATE AMPLIFY NUCLEIC ACID MADE HYDROPHILIC ACRYLATE MONOMER

[Pricing](#) [Current charges](#)

Derwent Searches: [Boolean](#) | [Accession/Number](#) | [Advanced](#)

Data copyright Thomson Derwent 2003



Copyright © 1997-2005 The Tho

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact U](#)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Januar 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/04555 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C08K 9/08,
9/10, G01N 33/50, C12Q 1/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/07326

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Juni 2001 (27.06.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 33 583.7 11. Juli 2000 (11.07.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];
51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KARLOU-EYRISCH,
Kamelia [IR/DE]; Lindenstr. 245, 40235 Düsseldorf
(DE). PODSZUN, Wolfgang [DE/DE]; Roggendorfstr.
55, 51061 Köln (DE). NEUMANN, Rainer [DE/DE];
Olefstr.11, 50937 Köln (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGE-
SELLSCHAFT; 51368 Leverkusen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 02/04555 A1

(54) Title: SUPERPARAMAGNETIC PEARL POLYMERS

(54) Bezeichnung: SUPERPARAMAGNETISCHE PERLPOLYMERISATE

(57) Abstract: The invention relates to cross-linked pearl polymers doped with superparamagnetic iron oxide, to a method for producing said pearl polymers, and to their use in nucleic acid diagnostics.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft vernetzte Perlpolymerisate dotiert mit superparamagnetischen Eisenoxid, ein Verfahren zur Herstellung der Perlpolymerisate, sowie deren Verwendung in der Nucleinsäuren Diagnostik.

Superparamagnetische Perlpolymerisate

Die Erfindung betrifft vernetzte Perlpolymerisate dotiert mit superparamagnetischen Eisenoxid, ein Verfahren zur Herstellung der Perlpolymerisate, sowie deren Verwen-
5 dung in der Nucleinsäuren Diagnostik.

In jüngster Zeit gewinnt die sogenannte Gen-Diagnostik zunehmend an Bedeutung.

Die Gen-Diagnostik hat Eingang gefunden in die Diagnostik humaner Erkrankungen
10 (u.a. Nachweis von Infektionserregern, Nachweis von Mutationen des Genoms, Entdeckung von zirkulierenden Tumorzellen und Identifizierung von Risikofaktoren für die Prädisposition einer Erkrankung). Aber auch in der Veterinärmedizin, der Umweltanalytik und Nahrungsmitteltestung findet die Gen-Diagnostik mittlerweile ihre Anwendung. Ein weiteres Anwendungsgebiet stellen Untersuchungen an patho-
15 logischen-/zytologischen Instituten oder im Rahmen forensischer Fragestellungen dar. Aber auch im Rahmen der Qualitätskontrolle (z.B. Untersuchungen von Blutproben auf Infektionserrger-Freiheit) wird die Gen-Diagnostik mittlerweile eingesetzt und der Gesetzgeber plant, solche Testungen per Gesetz in Zukunft anzuordnen. Methoden, die auch bei der Gen-Diagnostik zum Einsatz kommen (wie
20 z.B. Hybridisierungs- oder Amplifikationstechniken wie die PCR, bDNA oder NASBA Technologie) gehören auch bei wissenschaftlichen Grundlagenarbeiten zu den Routineverfahren.

Bei der Gen-Diagnostik ist die Gewinnung von Gen-Proben aus biologischem
25 Material, wie Zellen, Blut, Serum oder Urin ein wichtiger Teilschritt.

In der EP 0 707 077 wird eine Methode zur Isolierung von Nucleinsäuren aus biologischem Material unter Verwendung von löslichem, schwach basischem Poly-
mer beschrieben. Bei dieser Methode wird in einem sauren pH-Bereich einen
30 Fällungsprodukt aus dem löslichen, schwach basischen Polymer und der Nuclein-säure erzeugt, das Fällungsprodukt von den nicht gefällten Bestandteilen des

biologischen Materials abtrennt und gewaschen und die Nucleinsäure aus dem Fällungsprodukt durch Einstellung eines basischen pH-Wertes wieder freigesetzt.

5 Ein Nachteil der Methode nach EP 0707 077 besteht darin, dass die Handhabung, insbesondere die Abtrennung und Reinigung des Fällungsproduktes schwierig und sehr zeitaufwendig ist. Diese Methode lässt sich auch nicht bzw. nur unter erschweren Bedingungen mit Hilfe automatisierter Analysegeräte ausführen.

10 Die US 4339337 und US 5356713 beschreiben Methoden zur Herstellung von magnetischen Beads aus vinylaromatischen Polymer unter Verwendung von magnetischen Partikeln. Diese Perlpolymerisate enthalten allerdings keine funktionellen Gruppen zur Anbindung von Nucleinsäuren. Außerdem zeigen die Beads einen deutlichen Restmagnetismus (Remanenz), wodurch ihre Dispergierbarkeit erschwert wird.

15 In der WO 8303920 wird eine Methode zur Herstellung von magnetischen Polymerpartikeln beschrieben, bei der Polymerpartikel mit Lösungen aus beispielsweise Eisensalz behandelt werden, wobei das Eisen in Form von Eisenhydroxid ausgefällt wird. Bei dieser Methode befindet sich die ausgefällte Eisenverbindung sowohl in
20 den Polymerpartikeln als auch an der Oberfläche der Polymerpartikel. Für einige Anwendungen, beispielsweise für die Amplifikation von Nucleinsäuren durch Taqman-PCR kann die Eisenverbindung an der Oberfläche stören.

25 Die US 5206159 offenbart ein Verfahren zur Herstellung von superparamagnetischen Polyacrylamid-Trägern. Allerdings sind diese Träger zur Abtrennung von Nucleinsäuren ungeeignet.

30 Aus der US 5705628 ist eine Methode zur Bindung von DNA an magnetische Mikropartikel bekannt. Die magnetischen Mikropartikel haben vorzugsweise eine Teilchengröße von 1 µm und besitzen eine mit Carboxylgruppen beschichtete Oberfläche. Um eine Anbindung der DNA an die Partikel zu erreichen müssen spezielle Salzkonzentrationen verwendet werden.

zentration angewendet werden und Polyethylenglycol in definierter Konzentration und mit speziellem Molekulargewicht zugesetzt werden.

5 Es wurde nun gefunden, dass bestimmte vernetzte Perlpolymerisate, die mit superparamagnetischen Eisenoxid dotiert sind und basische Aminogruppen enthalten, in hervorragender Weise zur direkten und automatisierten Isolierung von Nucleinsäuren geeignet sind.

10 Gegenstand der Erfindung sind vernetzte Perlpolymerisate dotiert mit superparamagnetischen Eisenoxid und enthaltend basische Aminogruppen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Perlpolymerisate einpolymerisierte Einheiten aus hydrophilem (Meth)acrylat und Amino(meth)acrylate erhalten.

15 Unter der Bezeichnung (Meth)acrylat werden die Derivate der Acrylsäure und Methacrylsäure verstanden.

Hydropile (Meth)acrylate sind solche, deren Homopolymerisate in Wasser bei 25°C zu mehr als 2,5 % löslich sind. Beispielfhaft seien genannt. 2-Hydroxyethylmethacrylat, 2-Hydroxypropylmethacrylat, 2-Hydroxyethylacrylat, 2-Hydroxypropylacrylat, Triethylenglycolmonomethacrylat, Tetraethylenglycolmonomethacrylat, Glycerinmonomethacrylat, Acrylamid, Methacrylamid und N,N-Dimethylacrylamid. 20 Acrylamid ist bevorzugt.

25 Amino(meth)acrylate im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Derivate der Acrylsäure und Methacrylsäure mit vorzugsweise sekundären und tertiären Aminogruppen. Die Aminogruppen können auch Teil eines cycloaliphatischen oder aromatischen Rings sein. Geeignete Amino(meth)acrylate sind z.B. N-(3-Aminopropyl)methacrylamid, N-(3-Imidazolylpropyl)methacrylamid, N-(2-Imidazolethyl)methacrylamid, N-(3-Aminopropyl)acrylamid, N-(3-Imidazolylpropyl)acrylamid, N-(2-Imidazolethyl)acrylamid, N-(1,1-Dimethyl-3-Imidazolylpropyl)methacrylamid, N-(1,1-Dimethyl-3-Imidazolylpropyl)acrylamid, N-(3-Benzimida-

30

zoylpropyl)-methacrylamid und (3-Benzimidazolpropyl)acrylamid. Bevorzugte Amino(meth)acrylate sind Aminoalkyl(meth)acrylate, wie z.B. N,N-Dimethyl-aminoethylmethacrylat, N,N-Dimethylaminopropylmethacrylat, N,N-Dimethyl-aminoethylacrylat, und N-tert.-Butylaminopropylmethacrylat. N,N-Dimethylamino-ethylmethacrylat und N,N-Dimethylaminopropylmethacrylat sind besonders bevor-
5 zugt. Die Aminogruppen können in den erfindungsgemäßen Perlpolymerisaten ganz oder teilweise in protonierter Form, z.B. als Hydrochloride vorliegen.

Als Vernetzer kommen in Frage: Ethylenglycoldimethacrylat, Butandiol-
10 dimethacrylat, Hexandiolmethacrylat, Pentaerytritoldimethacrylat, 1,2-Glycerin-
dimethacrylat, 1,3-Glycerindimethacrylat, Triethylenglycoldimethacrylat, Tetra-
ethylenglycoldimethacrylat, Trimethylolpropantrimethacrylat, Pentaerytritotrimeth-
acrylat, Pentaerytritoltetramethacrylat, Ethylenglycoldiacrylat, Butandiol-
diacrylat, Pentaerytritoldiacrylat, 1,3-Glycerindiacrylat, Triethylenglycoldiacrylat, Trimethylol-
15 propantriacrylat, Pentaerytritotriacrylat, Pentaerytritoltetraacrylat, Allylmethacrylat,
Allylacrylat, Diethylenglycoldivinylether und Methylen-N,N'-bisacrylamid.
Methylen-N,N'-bisacrylamid ist bevorzugt.

Die Menge an hydrophilem (Meth)acrylat beträgt 30 bis 89 Gew.%, vorzugsweise
20 40 bis 75 Gew.%, die Menge und Amino(meth)acrylate 10 bis 69 Gew.%, vorzugs-
weise 20 bis 50 Gew.% und die Menge an Vernetzer 1 bis 25 Gew.%, jeweils
bezogen auf die Summe aus hydrophilem (Meth)acrylat, Amino(meth)acrylate und
Vernetzer.

25 Der Gehalt an Eisenoxid in den erfindungsgemäßen superparamagnetischen Perl-
polymerisaten beträgt 2 bis 80 Gew.%, vorzugsweise 4 bis 50 Gew.%, besonders
bevorzugt 5 bis 35 Gew.%, bezogen auf das Gewicht der ungequollenen Perlpolyme-
risate.

30 Die erfindungsgemäßen Perlpolymerisate sind superparamagnetisch, das heißt sie
besitzen eine niedrige Restmagnetisierung (Remanenz) und eine kleine Koerzitiv-

kraft. Ihre magnetische Sättigung ist hoch, sie werden von einem inhomogenen Magnetfeld stark angezogen. Nach Ausschalten des Magnetfeldes lassen sie sich leicht und vollständig in Wasser oder wässrigen Pufferlösungen dispergieren.

- 5 Die Teilchengröße der erfindungsgemäßen superparamagnetischen Perlpolymerisate beträgt 1 bis 200 μm , vorzugsweise 5 bis 100, besonders bevorzugt 10 bis 50 μm . Zur Bestimmung der mittleren Teilchengröße ($\bar{\phi}$) und der Teilchengrößenverteilung ist die mikroskopische Bildanalyse gut geeignet.
- 10 Als Maß für die Breite der Teilchengrößenverteilung der Perlpolymerisate wird das Verhältnis aus dem Mittelwert der Volumenverteilung (D_V) und dem Mittelwert der Anzahlverteilung (D_Z) gebildet. Enge Teilchengrößenverteilungen im Sinne der Erfindung bedeuten $D_V/D_Z \leq 2,5$, bevorzugt $D_V/D_Z \leq 2$, besonders bevorzugt $D_V/D_Z \leq 1,5$. Es wurde gefunden, dass erfindungsgemäße Perlpolymerisate mit enger
- 15 Teilchengrößenverteilung besonders gut zur Isolierung von Nucleinsäuren geeignet sind und bei Amplifikationsverfahren an der Oberfläche der Perlpolymerisate besonders gut reproduzierbare Ergebnisse liefern.

- 20 Die erfindungsgemäßen Perlpolymerisate besitzen eine Quellbarkeit in Wasser. Sie besitzen einen Quellungsindex von 1,25 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 (gemessen bei 25°C). Als Quellungsindex ist der Quotient aus dem Volumen des gequollenen Perlpolymerisates und dem Volumen des nicht gequollenen Perlpolymerisates definiert.

- 25 Zur experimentellen Bestimmung des Quellungsindex werden 10 ml getrocknetes, gesiebtes Perlpolymerisat in einem 100 ml-Standzylinder eingewogen. Der Quotient aus dem Volumen der Schüttung (V_0) und der eingewogener Menge (m) ergibt das Schüttvolumen (V_{sch}). Der Standzylinder wird mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und 10 bis 20 h bei 25° stehen gelassen. Dabei wurde öfter geschüttelt und darauf
- 30 geachtet, dass eventuell auftretende Luftblasen entweichen können. Das Volumen der

gequollenen Schüttung wird abgelesen und ergibt V_1 . Der Quotient aus V_1 und V_0 ist der Quellungsindex.

5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung vernetzter Perlpolymerisate, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man ein Monomergemisch aus hydrophilem (Meth)acrylat, Amino(meth)acrylat, Vernetzer und gegebenenfalls weiterem Monomer zu Perlen durch umgekehrte Suspensionspolymerisation polymerisiert und diese anschließend durch eine Nachbehandlung mit Eisensalz-Lösung mit superparamagnetischen Eisenoxid dotiert.

10

Unter umgekehrter Suspensionspolymerisation im Sinne der Erfindung wird ein Verfahren verstanden, bei dem das Monomergemisch aus hydrophilem (Meth)acrylat, Amino(meth)acrylat, Vernetzer und gegebenenfalls weiterem Monomer mit einem im Monomergemisch löslichen Radikalbildner aktiviert wird und das aktivierte Monomergemisch unter Zusatz eines Dispergierhilfsmittels in einem nicht wässrigem Lösungsmittel zu Tröpfchen emulgiert wird und dann die gebildeten Tröpfchen durch Temperaturerhöhung ausgehärtet werden.

15

Das hydrophile (Meth)acrylat, das Amino(meth)acrylat und der Vernetzer entsprechen den oben genannten Verbindungen. Das Amino(meth)acrylat kann dabei in vorteilhafter Weise zumindest teilweise in der Ammoniumform, beispielsweise als Hydrochlorid eingesetzt werden. Als weiteres Monomer kommen in Mengen von bis zu ca. 25 Gew.% bezogen auf das Gesamtmonomergemisch beispielsweise N-Vinylpyrrolidon, Vinylimidazol, Styrol, alfa-Methylstyrol, Chlormethylstyrol, Acrylnitril, Vinylacetat und Maleinsäureanhydrid in Frage. Es ist günstig, das Monomergemisch mit Wasser oder Wasser-Alkoholgemischen zu verdünnen. Geeignete Mengen an Verdünnungsmittel sind beispielsweise 10 bis 200 Gew.%, vorzugsweise 50 bis 150 Gew.% bezogen auf das Monomergemisch.

20

25

30 Als Radikalbildner sind Azoverbindungen und Peroxiverbindungen geeignet. Bei Verwendung von Wasser als Verdünnungsmittel ist Kaliumperoxodisulfat und

Natriumperoxodisulfat, auch in Kombination mit Bisulfit oder Hydrosulfit, gut geeignet. Weitere bevorzugte Radikalbildner sind die Azoverbindungen, wie 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane]dihydrochlorid und 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid. Der Radikalbildner wird in Mengen von 0,02 bis 2,5 Gew.%, vorzugsweise von 0,1 bis 1 Gew.% bezogen auf Gesamtmonomergemisch verwendet.

Als nicht wässriges Lösungsmittel im Sinne der vorliegenden Erfindung sind in erster Linie Kohlenwasserstoffe und Halogenkohlenwasserstoffe, sowie niedrig viskose Siliconöle geeignet. Bevorzugt sind lineare, verzweigte und cyclische aliphatische Kohlenwasserstoffe. Beispielhaft sei erwähnt Hexan, Heptan, n-Octan, iso-Octan, iso-Dodecan und Cyclohexan. Natürlich können auch Mischungen aus unterschiedlichen Kohlenwasserstoffen verwendet werden.

Als Dispergierhilfsmittel sind öllösliche Polymerisate mit einem Molekulargewicht von 2000 bis 1 000 000 geeignet. Bevorzugt sind Polymerisate mit einem Anteil von einpolymerisierten Einheiten von C₆- bis C₂₂-Alkyl(meth)acrylaten und/oder Vinyl-ester von C₆- bis C₂₂-Carbonsäuren. Beispielhaft seien Polymerisate mit einpolymerisierten Einheiten von Stearyl-methacrylat, Lauryl-methacrylat und Vinylstearat genannt. Besonders gut geeignet sind Copolymerisate aus C₆- bis C₂₂-Alkyl(meth)acrylaten bzw. Vinylester von C₆- bis C₂₂-Carbonsäuren und hydrophilen Monomeren. Unter hydrophilen Monomeren werden in diesem Zusammenhang polymerisierbare olefinisch ungesättigte Verbindungen, die ganz oder teilweise (zu mehr als 2,5 Gew.-% bei 20 °C) in Wasser löslich sind, verstanden. Als Beispiele seien genannt: Acrylsäure und ihre Alkali- und Ammoniumsalze, Methacrylsäure und ihre Alkali- und Ammoniumsalze, Hydroxyethylmethacrylat, Hydroxyethylacrylat, Diethylenglykolmonoacrylat, Diethylenglykolmonomethacrylat, Triethylenglykolmonoacrylat, Triethylenglykolmonomethacrylat, Tetraethylenglykolmonoacrylat, Tetraethylenglykolmonomethacrylat, Glycerinmonoacrylat, Aminoethylmethacrylat, N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat, Acrylamid, Methacrylamid, Vinylpyrrolidon und Vinylimidazol. Bevorzugt werden Hydroxyethylmethacrylat, Aminoethyl-

methacrylat, N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat, Acrylamid, Methacrylamid, Vinylpyrolidon und Vinylimidazol.

Besonders bevorzugte Dispergierhilfsmittel sind Copolymerisate aus

5

- 75 bis 99 Gew.% C₆- bis C₂₂-Alkyl(meth)acrylat und/oder Vinylester von C₆- bis C₂₂-Carbonsäuren und
- 1 bis 25 Gew.% hydrophiles Monomer aus der Gruppe Hydroxyethylmethacrylat, Aminoethylmethacrylat, N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat, Acrylamid, Methacrylamid, Vinylpyrolidon und Vinylimidazol.

10

Die Einsatzmenge des Dispergierhilfsmittels beträgt im allgemeinen 0,1 bis 8, vorzugsweise 0,5 bis 5 Gew.-%, bezogen auf das nicht wässrige Lösungsmittel.

15

Die Rührgeschwindigkeit bei der Polymerisation ist wichtig für die Einstellung der Teilchengröße. Beim erfindungsgemäßen Verfahren nimmt die Größe der erhaltenen Perlpolymerisate mit zunehmender Rührerdrehzahl ab. Die exakte Rührerdrehzahl zur Einstellung einer bestimmten vorgegebenen Perlgröße hängt im Einzelfall stark von der Reaktorgröße, der Reaktorgeometrie und der Rührergeometrie ab. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die notwendige Rührerdrehzahl experimentell zu ermitteln. Für Laborreaktoren mit 0,5l-Reaktionsvolumen, die mit Gitterrührer ausgestattet sind, werden bei Verwendung von Copolymerisaten aus Methacrylsäure-C₁₃-Ester und Hydroxyethylmethacryl als Dispergierhilfsmittel im allgemeinen Perldurchmesser von 10 bis 25 µm bei Drehzahlen von 800 bis 1000 Upm erreicht.

20

25

Die Polymerisationstemperatur richtet sich nach der Zerfallstemperatur des eingesetzten Initiators und der Siedetemperatur des nicht wässrigen Lösungsmittels. Sie liegt im allgemeinen zwischen 50 bis 150 °C, vorzugsweise zwischen 55 und 100 °C. Die Polymerisation dauert 0.5 bis einige Stunden (beispielsweise 10 Stunden).

30

Nach der Polymerisation kann das Polymerisat mit üblichen Methoden, z.B. durch Filtrieren oder Dekantieren, isoliert und gegebenenfalls nach ein oder mehreren Waschvorgängen getrocknet werden. Es ist möglich, das erhaltene Perpolymerisat durch physikalischen Methoden zu fraktionieren, um eine engere Teilchen-
5 größenverteilung einzustellen. Geeignete Fraktionierungsmethoden sind beispielsweise Sieben, Sedimentieren und Windsichten.

Die Nachbehandlung zur Dotierung mit superparamagnetischen Eisenoxid erfolgt mit Mischungen aus wässrigen Fe^{2+} - und Fe^{3+} -salz-Lösungen. Gut geeignet sind die entsprechenden Chloride. Das molare Verhältnis von Fe^{2+} : Fe^{3+} soll dabei 2:1 bis 1:2 betragen. Dabei ist es möglich von Eisensalzlösungen mit einem anderen Fe^{2+} : Fe^{3+} -Verhältnis auszugehen und das optimale Verhältnis von Fe^{2+} : Fe^{3+} durch Verwendung von Oxidations- bzw. Reduktionsmitteln einzustellen. Beispiele für Oxidations-
10 mittel sind Peroxo- und Nitroverbindungen, als Reduktionsmittel ist z.B. Natriumbisulfit geeignet. Die Konzentration der Eisensalzlösungen beträgt im allgemeinen
15 10 bis 50 Gew.%, vorzugsweise 20 bis 40 Gew.%.

Die Eisensalzlösung wird vorzugsweise mit getrocknetem, wasserfreien Perlpolymerisat in Kontakt gebracht. Dabei ist es besonders vorteilhaft, wenn die gesamte
20 Eisensalzlösung in das Perlpolymerisat einquillt und keine überschüssige Eisensalzlösung in den Zwischenräumen der Perlen oder an der Oberfläche der Perlen verbleibt.

Die in das Perlpolymerisat eingequollenen Eisensalze werden durch Zusatz von
25 Basen in die entsprechenden Eisenhydroxide überführt. Gut geeignet sind alkalische Lösungen aus Natriumhydroxid, Natriumcarbonat oder Ammoniak. Ammoniak ist bevorzugt, da ein Überschuss leicht durch Abdampfen entfernt werden kann. Gebildete Ammoniumsalze werden durch gründliches Waschen mit Wasser entfernt.

30 Zur Überführung des Eisenhydroxids in Eisenoxid (Dehydratisierung) wird das Perlpolymerisat erhitzt. Die Wärmebehandlung kann dabei in einfacher Weise in

wässriger Suspension bei 65 bis 100°C erfolgen. Geeignete Zeiten für die Erhitzung sind 0,5 bis 5 Stunden. Die Umwandlung des Eisenhydroxids in Eisenoxid ist an einen Wechsel der Farbe von hell braun nach dunkelbraun bis schwarz erkennbar. Danach wird das Perlpolymerisat abgetrennt und getrocknet.

5

Falls gewünscht können die so erhaltenen getrockneten mit superparamagnetischen Eisenoxid dotierten Perlpolymerisate ein weiteres Mal in der oben beschriebenen Weise behandelt werden, wobei der Gehalt an superparamagnetischen Eisenoxid gesteigert wird. Auf diese Weise gelingt es Eisenoxidgehalte von mehr als 50 Gew.% einzustellen.

10

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, umfassend die nachfolgenden Schritte

15

A) Vermischen der Probe mit einem Perlpolymerisat bei einem pH-Wert von 7 oder weniger, wobei die Nucleinsäuren adsorbiert werden,

B) Abtrennen des Perlpolymerisates einschließlich der adsorbierten Nukleinsäuren unter Anwendung eines Magnetfeldes

20

und

C) Vermischen des Perlpolymerisates mit einer wässrigen Phase mit einem pH-Wert von größer 7, wobei die adsorbierten Nucleinsäuren freigesetzt werden,

25

welches dadurch gekennzeichnet ist, dass das Perlpolymerisat mit superparamagnetischen Eisenoxid dotiert ist und einpolymerisierte Einheiten aus hydrophilem (Meth)acrylat und Amino(meth)acrylate enthält.

30

Das erfindungsgemäße Verfahren ist zur Isolierung und/oder Reinigung von Nucleinsäuren unterschiedlicher Herkunft, beispielsweise aus Zellen, Gewebematerialien,

Blut oder Infektionserregern geeignet. Vor der Isolierung der Nucleinsäuren wird das zu untersuchende Material durch an sich bekannte Techniken, wie z.B. Aufschluss durch Proteaseverdau aufgeschlossen, wobei eine für die weiteren Schritte A bis C geeignete Probe, ein Lysat, erhalten wird. Gegebenenfalls erfolgt in einem Zwischen-

5 schritt nach Verfahrensschritt A) die Lyse des biologischen Materials. Weitere geeignete Aufschlussverfahren sind in DE-A-4 333 805 beschrieben worden.

Es erfolgt das Vermischen der Probe mit dem erfindungsgemäßen Perlpolymerisat bei einem pH-Wert von 7 oder weniger, vorzugsweise im Bereich von 2 bis 6,

10 besonders bevorzugt im Bereich von 2 bis 3 bei Raumtemperatur. Das Abtrennen des Perlpolymerisates erfolgt mit Hilfe eines Magnetfeldes. Der so gewonnene Komplex aus Nucleinsäure und Perlpolymerisat kann nun durch Waschen mit geeigneten Puffern gereinigt werden.

15 Zur Freisetzung der gebundenen Nucleinsäuren aus dem Komplex erfolgt nun die pH-Einstellung des Komplexes auf pH-Werte oberhalb von 7, vorzugsweise von 8 bis 14, besonders bevorzugt im Bereich 12 bis 14.

Die erfindungsgemäßen Perlpolymerisate liefern höhere Adsorption- und Wiederfreisetzungsraten als die löslichen Polymerisate gemäß EP-A-0 707 077. Die Isolierung lässt sich leichter, d.h. mit weniger Arbeitsschritten und in kürzeren Zeiten durch-

20 führen. Die Reinheit der isolierten Nucleinsäuren ist höher, insbesondere enthalten sie weniger inhibierende Nebenprodukte, so dass eine Verstärkung der Nucleinsäuren, beispielsweise durch die sogenannte "PCR-Reaktion" und die "RT-PCR"

25 besonders gut gelingt. Auch in Bezug auf Verdau der gewonnenen Nucleinsäuren mittels Restriktionsenzymen ist das erfindungsgemäße Verfahren der in der EP-A-0 707 077 beschriebenen Methode überlegen.

Die erfindungsgemäßen Perlpolymerisate sind auch gut geeignet, um eine Ver-

30 stärkung der adsorbierten Nukleinsäuren beispielsweise durch die sogenannte

„Taqman-PCR-Reaktion“ direkt auf den Perlpolymerisaten (d.h. ohne Teilschritt C) durch zuführen.

Beispiel 1

Herstellung eines erfindungsgemäßen Perlpolymerisates

5 1a) Herstellung eines Dispergierhilfsmittels

In einem 4 l-Reaktionsgefäß mit Gitterrührer, Gaseinlass- und Gasauslassrohr wurde unter Stickstoffbegasung eine Lösung aus 1324 g Cyclohexan, 511 g Methacrylsäure-C₁₃-Ester, 57 g Hydroxyethylmethacrylat und 3,8 g Dibenzoylperoxyd innerhalb von 2 h bei 300 Upm auf 78°C erhitzt, 10 h bei dieser Temperatur belassen, anschließend
10 auf 90°C erhitzt und weitere 1,5 h bei dieser Temperatur belassen. Danach wurde auf 25°C abgekühlt. Man erhielt 1835 g einer 30,5 gew.-%igen Lösung eines Dispergiermittels. Der Staudinger-Index, gemessen mit Ubbelohde-Viskosimeter bei 25°C, betrug 72,6 ml/g.

15 1b) Herstellung eines vernetzten Perlpolymerisates

In einem 0,5 Liter-Reaktionsgefäß mit Gitterrührer, Rückflusskühler und Thermofühler wurden 41,25 g Dispergiermittel-Lösung aus 1a) und 240 g Cyclohexan vorgelegt und gerührt. 9,38 g N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat wurde mit 13,3 g Wasser und 5,89 g 37 %iger Salzsäure 5 Minuten gerührt und mit 0,6 g 1n NaOH
20 neutralisiert. Anschließend wurde diese Lösung in das Reaktionsgefäß gegeben. Zu dieser Mischung wurden 20,31 g Acrylamid und 1,56 g Methylen-N,N'-bisacrylamid, gelöst in 8 g Methanol, zugegeben. Diese Reaktionsmischung wurde mit 0,063 g Kaliumperoxidisulfat, gelöst in einer Mischung aus 4,25 g Wasser und 2 g Methanol, versetzt und bei 450 Upm 10 Minuten mit Stickstoffgas gespült.
25 Anschließend wurde die Rührgeschwindigkeit auf 1000 Upm gesteigert und die Temperatur innerhalb von 1 Stunde auf 60 °C erhöht und 10 Stunden bei dieser Temperatur belassen. Nach dem Abkühlen wurde das entstandene Polymerisat durch Dekantieren von der Reaktionslösung abgetrennt und je dreimal mit Cyclohexan, Wasser und Methanol gereinigt und bei 40°C im Vakuumtrockenschrank getrocknet.
30 Man erhielt 14,7 g getrocknetes Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 12 µm und einem Quellungsindex von 6 bei 25°C in Wasser.

1c) Dotierung des Perlpolymerisates mit Eisenoxid

In einem Rührgefäß mit einem Magnetrührer und Thermometer wurden 3,625 g Eisen(II)chlorid-Tetrahydrat, 1,5 g Eisen (III))chlorid (wasserfrei) und 0,3 g Natriumbisulfit in 5,75 ml Wasser gelöst.

In einem 100 ml Dreihalskolben wurden 5 g getrocknetes Perlpolymerisat (1b) vorgelegt und extern mit Eis gekühlt und anschließend mit der oben beschriebenen Eisensalzlösung versetzt. Die entstehende Suspension wurde 35 Minuten gerührt und anschließend mit kochendem Wasser extern erwärmt bis aus der Suspension eine feste Mischung entstanden war. Anschließend wurde das Perlpolymerisat in einem anderen 500 ml Kolben mit einer alkalischen Lösung aus 67,5 ml Wasser und 8,5 ml 26%iger Ammoniak-Lösung (pH = 9) 1 Stunde gerührt und mit 250 ml Wasser verdünnt. Nach dem Abdekantieren der Lösung wurde dieser Vorgang mehrfach wiederholt.

Das mit Eisensalzlösung behandelte Perlpolymerisat wurden mit 300 ml Wasser versetzt und unter Luftstrom 30 Minuten gerührt und anschließend auf 72°C erwärmt. Der pH-Wert wurde während des gesamten Vorgangs durch Zugabe von Ammoniaklösung auf 9 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit 0,155 g Kaliumperoxodisulfat versetzt und weitere 2,5 Stunden bei 72°C erwärmt. Nach dem Abdekantieren der Flüssigkeit wurde der Feststoff fünfmal mit Wasser gewaschen und dabei mit Ultraschall behandelt. Man erhielt 5,1 g schwarzes Perlpolymerisat mit einem Eisengehalt von 6 Gew.%, welches von einem inhomogenen Magnetfeld stark angezogen wird.

Beispiel 2

Herstellung eines erfindungsgemäßen Perlpolymerisates

2a) Herstellung eines vernetzten Perlpolymerisates

- 5 In einem 0,5 Liter-Reaktionsgefäß mit Gitterrührer, Rückflusskühler und Thermofühler wurden 41 g Dispergierhilfsmittel-Lösung aus 1a) und 240 g Cyclohexan vorgelegt und gerührt. 9,38 g N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat wurde mit 13,3 g Wasser und 6 g 37 %ige Salzsäure 5 Minuten gerührt. Anschließend wurde diese Lösung in das Reaktionsgefäß gegeben. Zu dieser Mischung wurde 18,75 g Acryl-
10 amid und 3,13 g Methylen-N,N'-bisacrylamid, gelöst in 8 g Methanol, zugegeben. Diese Reaktionsmischung wurde mit 0,313 g 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid, gelöst in einer Mischung aus 4,25 g Wasser und 2 g Methanol, versetzt und bei 450 Upm 10 Minuten mit Stickstoffgas gespült. Anschließend wurde die Temperatur innerhalb von 1 Stunde bei 800 Upm auf 60°C erhöht und
15 10 Stunden bei dieser Temperatur reagieren lassen. Nach dem Abkühlen wurde das entstandene Polymerisat durch dekantieren von der Reaktionslösung abgetrennt und je dreimal mit Cyclohexan, Wasser und Methanol gereinigt und bei 40°C im Vakuumtrockenschrank getrocknet. Man erhielt 15 g getrocknetes Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 20 µm und einem Quellungsindex von 5 bei
20 25°C in Wasser.

2b) Dotierung des Perlpolymerisates mit Eisenoxid

- 5 g des Perlpolymerisates aus 2a) wurde wie unter 1d) beschrieben mit Eisenoxid dotiert. Dabei wurde der gesamte Vorgang zweifach durchgeführt. Man erhielt 5,4 g
25 schwarzes Perlpolymerisat mit einem Eisengehalt von 8,3 Gew.%, welches von einem inhomogenen Magnetfeld stark angezogen wird.

Patentansprüche

1. Vernetzte Perlpolymerisate dotiert mit superparamagnetischen Eisenoxid und
enthaltend basische Aminogruppen, dadurch gekennzeichnet, dass die Perl-
polymerisate einpolymerisierte Einheiten aus hydrophilem (Meth)acrylat und
Amino(meth)acrylate erhalten.
2. Vernetzte Perlpolymerisate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass
das hydrophile (Meth)acrylat (Meth)acrylamid ist.
3. Vernetzte Perlpolymerisate nach Anspruch 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet,
dass das Amino(meth)acrylat ein Aminoalkylmethacrylat ist.
4. Vernetzte Perlpolymerisate nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass
die Perlpolymerisate einpolymerisierte Einheiten aus (Meth)acrylamid und
Dialkylaminoalkyl(meth)acrylate und Methylenbis(meth)acrylamid als Ver-
netzer enthalten.
5. Vernetzte Perlpolymerisate nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet,
dass sie eine Teilchengröße von 5 bis 100 µm besitzen.
6. Vernetzte Perlpolymerisate nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass
die Teilchengrößenverteilung D_v/D_z kleiner als 2,5 ist.
7. Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren unter Verwendung der Perlpoly-
merisaten gemäß Anspruch 1 bis 6.
8. Verfahren zur Herstellung vernetzter Perlpolymerisate, dadurch gekenn-
zeichnet, dass man ein Monomergemisch aus hydrophilem (Meth)acrylat,
Amino(meth)acrylate, Vernetzer und gegebenenfalls weiteren Monomeren zu
Perlen durch umgekehrte Suspensionspolymerisation polymerisiert und diese

durch eine Nachbehandlung mit Eisensalzlösung mit superparamagnetischen Eisenoxid dotiert.

- 5 9. Verfahren zur Herstellung vernetzter Perlpolymerisate nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass Amino(meth)acrylate teilweise oder ganz in Form eines Ammoniumsalzes eingesetzt wird.
- 10 10. Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäuren durch PCR, insbesondere Taqman PCR auf der Oberfläche von Partikeln, dadurch gekennzeichnet, dass
10 die Partikel Perlpolymerisate gemäß Anspruch 1 bis 6 sind.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

IPC, EP 01/07326

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C08K9/08 C08K9/10 G01N33/50 C12Q1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08K G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 199937 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A89, AN 1999-435595 XP002184095 & JP 11 176622 A (NIPPON GOSEI GOMU KK), 2 July 1999 (1999-07-02) abstract	1-10
Y	EP 0 707 077 A (JOHNSON & JOHNSON CLIN DIAG) 17 April 1996 (1996-04-17) cited in the application page 6, line 32 claim 1	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 November 2001

Date of mailing of the international search report

11/12/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Siemens, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
I ... EP 01/07326

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 199 12 799 A (AGOWA GES FUER MOLEKULARBIOLOG) 16 September 1999 (1999-09-16) claims 1-19 -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
P 01/07326

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 11176622	A	02-07-1999	NONE
EP 0707077	A	17-04-1996	US 5582988 A 10-12-1996
		AU 706641 B2 17-06-1999	
		AU 3030295 A 28-03-1996	
		CA 2158485 A1 16-03-1996	
		EP 0707077 A2 17-04-1996	
		FI 954331 A 16-03-1996	
		JP 8173194 A 09-07-1996	
		NO 953631 A 18-03-1996	
DE 19912799	A	16-09-1999	DE 19912799 A1 16-09-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int	nales Aktenzeichen
P	P 01/07326

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C08K9/08 C08K9/10 G01N33/50 C12Q1/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C08K G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 199937 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A89, AN 1999-435595 XP002184095 & JP 11 176622 A (NIPPON GOSEI GOMU KK), 2. Juli 1999 (1999-07-02) Zusammenfassung ---	1-10
Y	EP 0 707 077 A (JOHNSON & JOHNSON CLIN DIAG) 17. April 1996 (1996-04-17) in der Anmeldung erwähnt Seite 6, Zeile 32 Anspruch 1 --- <div style="text-align: center;">-/--</div>	1-10



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. November 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/12/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Siemens, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/JP 01/07326

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DE 199 12 799 A (AGOWA GES FUER MOLEKULARBIOLOG)</p> <p>16. September 1999 (1999-09-16)</p> <p>Ansprüche 1-19</p> <p>-----</p>	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/07326

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
JP 11176622	A	02-07-1999	KEINE		
EP 0707077	A	17-04-1996	US	5582988 A	10-12-1996
			AU	706641 B2	17-06-1999
			AU	3030295 A	28-03-1996
			CA	2158485 A1	16-03-1996
			EP	0707077 A2	17-04-1996
			FI	954331 A	16-03-1996
			JP	8173194 A	09-07-1996
			NO	953631 A	18-03-1996
DE 19912799	A	16-09-1999	DE	19912799 A1	16-09-1999